

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-115274
(43)Date of publication of application : 26.05.1987

(51)Int.CI. C12N 1/00
// C12N 1/14
C12N 1/20

(21)Application number : 60-256225 (71)Applicant : AJINOMOTO CO INC
(22)Date of filing : 15.11.1985 (72)Inventor : ISHIBASHI MASATOSHI
KOYAMA YOSUKE
AKASHI KUNIHIKO

(54) CULTIVATION OF MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently form pellets with a small amount of spores, by inoculating conidia of a microorganism having conidium-forming ability into a liquid culture medium, stationarily cultivating and then aerobically cultivating the microorganism.

CONSTITUTION: Conidia of a microorganism having conidium-forming ability are inoculated into a liquid culture medium and stationarily cultivated during a time of forming mycelia. The culture fluid after the stationary cultivation is collected or transferred to a new liquid culture medium and cultivated by an ordinary aerobic cultivation method. The ratio of numbers of spores required for forming one pellet is reduced to a value as low as ≤ 1 as compared with a conventional one of about 10,000 and a given amount of pellets can be obtained even with a small amount of inoculated spores.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Date of filing]

[Patent number]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Rejection] [Date of extinction of right]

丸印

A

未請求取下

印

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-115274

⑬ Int. Cl. 4

C 12 N 1/00
// C 12 N 1/14
1/20

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)5月26日

A-6712-4B
B-6712-4B
G-6712-4B

7115-4B 審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 微生物の培養方法

⑯ 特 願 昭60-256225

⑰ 出 願 昭60(1985)11月15日

⑱ 発 明 者 石 橋 政 俊 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 発 明 者 小 山 洋 介 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑳ 発 明 者 明 石 邦 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明細書

1. 発明の名称

微生物の培養方法

2. 特許請求の範囲

分生胞子形成能を有する微生物の分生胞子を液体培地に接種し、一定時間静置培養を行った後にこの培養液をそのまま又は新しい液体培地に移行して好気培養することを特徴とする分生胞子形成能を有する微生物の培養方法

3. 発明の詳細な説明

<発明の目的>

本発明は分生胞子形成能を有する微生物の菌糸体形成を効率的に行なわしめる為の培養方法に関する。

<産業上の利用分野>

分生胞子形成能を有する微生物はアミノ酸、有機酸、ビタミン、製ガン剤、抗生物質、プロテアーゼ・グルコアミラーゼ・グルコースオキシダーゼなどの酵素類、色素及び酵素阻害剤などの生産に広く利用されている。

<従来の技術>

分生胞子形成能を有する微生物の培養方法に関しては従来より多くの研究がなされている。

分生胞子形成能を有する微生物を液体培地で好気的に培養すると菌糸体はパルプ状とペレット状(小球状)の2形態をとる。培養中に菌糸体がパルプ状の形態になった場合には、目的とする生産物の生産性が低下することと、菌糸体と培養液の分離性が低下することなどの欠点を有している。従って該微生物を工業的に液体培地で好気的に培養を行う場合にはペレット状の菌糸体を形成させることが望まれる。

しかしながら該微生物を液体培養してペレット状菌糸体を形成させるに要する分生胞子数は、例えば 10^2 個/ ml のペレットを得る為に 10^6 個/ ml (接種胞子/形成ペレット = 10^4) と多量の胞子を必要とする。該培養を工業的な大型培養槽で行なわしめる場合極めて大量の胞子を必要とすることから現実的には不可能に近い。又、仮りに大規模な固体培養法による胞子の大量製造を可能にさせ得

たとしても、この方法は固体培地で培養するので温度、湿度などの培養管理が容易でないことと、装置全体を完全な無菌管理下におくことができないため細菌に汚染される危険が高く、純粋培養が極めて困難であるという欠点を有する。

＜本発明が解決しようとする問題点＞

本発明が解決しようとする問題点は当該微生物を工業的規模で少量の胞子で効率よくペレットを形成させる培養法を確立することにある。

＜問題点を解決するための手段＞

本発明者らは上述の問題点を解決するために観察研究を重ねた。

本発明者らは液体培地中での分生胞子形成能を有する微生物の発芽率を測定するために適宜者取した胞子液を接種し、静置培養で胞子の発芽状況を観察したところ、時間の経過に伴なって発芽してきた菌糸は、接種した胞子数が多い区では長い網状の菌糸体となつたが、胞子数の少ない区では糸状の菌糸の他に、周辺が纖毛状で円い扁平な菌糸体が肉眼で観察された。

(3)

エノール酸生産菌であるペニシリウム・ブレビ・コンパクタム (*Penicillium brevi Compactum*) AJ 117096 (FERM-P5693)、ペニシリン生産菌であるペニシリウム・クリンゲナム (*P. chrysogenum*) AJ 7343 (ATCC 10002)、グルコースオキシダーゼ生産菌であるペニシリウム・パープロゲナム (*P. parprogenum*) AJ 17045 (FERM-P1846)、セファロスボリン C 生産菌としてセファロスボリウム・ボリアラム (*Cephalosporium Polyaleurum*) AJ 6993 (ATCC 20359)、プロテアーゼ生産菌としてはアスペルギルス・フェニシス (*Aspergillus Phoenicis*) AJ 17083 (ATCC 14332)、グルコアミラーゼ及びクエン酸生産菌としてアスペルギルス・ニガ (A. niger) AJ 7172 (ATCC 9642)、ホスホマニシン生産菌であるストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス (*Streptomyces Viridochromogenes*) ATCC 21240 等が使用される。

本発明において使用する液体培地は該微生物が生育する液体培地であればどのような培地でも使用できる。

(5)

この円盤状の菌糸体が成長すればペレット状になるのではないかと考え、通常の好気培養に移し培養を継続したところ、所定のペレットが得られた。

本発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は分生胞子形成能を有する微生物の分生胞子を液体培地に接種し、一定時間静置培養を行った後にこの培養液をそのまま又は新しい液体培地に移行して好気培養することを特徴とする分生胞子形成能を有する微生物の培養方法に関する。

本発明に使用される微生物は糸状菌、放線菌、担子菌など分生胞子形成能を有する微生物であればいすれでもよい。

具体的に例示すると L-フェニルアラニン・アンモニアリーゼ生産菌であるクラドスボリウム・コロカシエ (*Cladosporium colossiae*) AJ 6667 [IFO 6698]、ゴナトボトリウム・アピカムラタム (*Gonatobotryum apiculatum*) IFO 9098、ミコフ

(4)

例えはフェニルアラニン・アンモニアリーゼ生産用培地としては第1表の培地が、ミコフェニール酸生産用培地としては公知の培地、W.L.Muth *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, 8, 321-327 (1975) 記載の培地等が使用される。ペニシリン発酵用培地としては Johnson 等の合成功地 (住木論介 "抗生素質" 上, P. 177, 1961) が使用される。セファロスボリン C 発酵用培地としては例えば A.L.DEMAIN, J.F.NEWKIRK, and D.HENDLIN, *J.Bacteriol.*, 85, 339 (1963) 記載の培地の改変培地が使用される。

グルコアミラーゼ生産用培地としては第1表に示した組成の培地が使用される。

ホスホマニシン生産用の培地としては第1表に示した組成の培地などが使用される。

分生胞子のとり方は、例えばポテトアキストロース寒天培地などに当該微生物を培養し、生成した胞子を 0.1 % Tween 80 など界面活性剤を含有する溶液中に懸滴し調製すればよい。

静置培養の方法は液体培地に接種した分生胞子

(6)

をこの微生物の生育できる温度で、菌糸が生成していく時間そのまま放置すればよいが、少量の通気を行なってもよい。放置の時間は菌種によっても異なるが、肉眼観察が可能となる通常12時間以上であればよい。

静置培養を行なった培養液は、そのまま又は新しい液体培养基に移行して回転あるいは振盪、又は通気搅拌及び気泡塔型培養槽で通気を行なう等、通常の好気培養方法で培養すればよい。

ペレットを形成させる温度はこの微生物が生育できる温度であればどのような温度でもよいが、有用物質を生産する至適培養温度を使用することが好ましい。

本発明の方法によって生産される各種有用物質は各々の公知の方法で定量及び採取することができる。

培養液中のミコフェノール酸は高速液体クロマトグラムにより分析定量を行ない、ペニシリンGの定量はStaphylococcus aureusを用いる國家検定法、セファロスボリンCはCorynebacterium farringtoni

(7)

実施例 1

グラドスボリウム・コロカシエAJ 6667 (IFO 6698)をボナトデキストロース寒天培地“榮研”に接種し、26°Cにて7日間培養後、胞子を0.1%Tween 80含有水溶液に懸濁し、その一定容量を第1表に示す培地(300ml容三角フラスコに50mlの培地を張込み)に接種し、26°Cで静置培養を行ない、その後26°Cで40時間220rpmで回転培養を行なった。接種した胞子数は胞子懸濁液をThoma氏血球計で測定、遠宣希釈して胞子数を変化させた。

第1表

成 分	濃度(g/dl)
ポリペプトン	1.0
酵母エキス	1.0
K ₂ HPO ₄	0.3
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
フェヌルアラニン	0.5

(pH 6.0, 120°C, 20分加熱)

(8)

の生育阻止円法を用いて行なった。

ホスホマイシンの定量はEscherichia coli K-12, ATCC 10798の生育阻止円法で行なった。

グルコアミラーゼ活性の測定は糖化力測定法(“実験化学講座”24巻, P 272, 1961)に依った。

以上説明したように本発明は通常の好気培養に先立ち、静置培養を行なう事を特徴とする分生胞子形成能を有する微生物の培養方法に関するものである。

<作用及び効果>

本発明の完成により1ペレットを形成するに要する胞子数の比(以下C/Pと略す。)が従来の10,000程度に対し1以下にする事も可能となつた。本発明の方法は、従来の胞子接種量に対し極めて少量の胞子接種量でも所定量のペレットを生産する事ができる。これによつて、有用物質の生産量も向上し、かつ菌体と培養液の分離性も向上するため工業的実用価値は極めて大きい。

以下、実施例にて説明する。

(9)

菌の生育は東洋滤紙No.5を用いて吸引濾過後105°Cで18時間乾燥した乾燥重量で示した。ペレット数は適量をサンプリングし肉眼で計数し、フラスコ全量での値で示した。

結果は第2表に示した。

(10)

2 緒

接觸原子数(1) (ケ/ラスコ)	静電荷量 (h)	回転粘度 (h)	形成ペルト(2) (ケ/ラスコ)	C/P比 (1)/(2)	
				生 青	青 (g/ds)
2.5×10 ⁷	左レ	6.4	1×10 ⁵	0.52	25.000
2.5×10 ⁷	左レ	6.4	1×10 ³	0.38	25.000
2.5×10 ⁵	左レ	4.0	1×10 ²	0.05	2.500
2.5×10 ³	左レ	4.0	1m	0.005以下	—
2.5×10 ²	左レ	4.0	1m	—	—
2.5×10 ¹	左レ	4.0	1m	—	—
2.5×10 ⁵	左レ	4.0	1.4×10 ³	0.50	179
2.5×10 ³	左レ	4.0	9.0×10 ¹	0.12	28
2.5×10 ²	左レ	4.0	2.5×10 ¹	0.005以下	10
2.5×10 ¹	左レ	4.0	1m	—	—
2.5×10 ⁵	左レ	4.8	9.5×10 ²	0.66	3
2.5×10 ²	左レ	4.8	2.5×10 ²	0.39	1
2.5×10 ¹	左レ	4.8	1.7×10 ¹	0.005以下	1.5

(11)

实施例 3

ペニシリウム・ナレビコンバクタム AJ 117096
(FERM-P 5693) を第4表に示す天然斜面培地に接種し、27℃にて10日間培養後、胞子を採取し、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し、その一定容量を第5表に示す培地 (300 ml用三角フラスコに50 ml培地張込み) に接種し、27℃にて5日間 226 rpm 下回転培養を行なった。

胞子を静置培養せずに回転培養した実験区を(A)とし、48時間静置培養後回転培養を行なった区を(B)とし、結果を第6表に示した。

第 4 章

成 分	濃度 (g/dL)
グルコース	1.0
ペプトン	0.2
麦芽エキス	0.1
酵母エキス	0.1
天	1.5

(pH 7.0, 120°C 20分钟酶解)

(13)

(一) 計算不能
filamentous mycorrhizal 線毛狀菌糲

实施例 2

実施例 1 と同様な方法で調製した胞子液の胞子 2.8×10^4 個を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml を張込んだ第 1 表培地に接種し、26℃で静置培養を行なった。

静置培養終了液全量 (100 ml) を同じく第 1 表の培地 1.4 l を張込んだ 3.0 l 小型ジャーファーメンターに移し、通気 ($1/4 \text{ V.V.M}$)、攪拌 (700 rpm) 培養を行なった。又、併行して静置培養を行なわず、胞子 2.8×10^4 個を直接小型ジャーファーメンターに播種したものの培養も行なった。結果を第 3 表に示した。

第 3 表

静置培養 (h)	ジャー培養 (h)	形成ペレット数 (ヶ/ジャー全量)	乾燥重量 (g/dL)	C/P 比
なし	48	1.4×10^2	0.01	200
	88	1.4×10^2	0.02	200
48	40	8.4×10^4	0.41	0.3

(12)

第 5 表

成 分	濃 度
グルコース	5.0 (g/dL)
グリシン	1.46
メチオニン	0.05
KH_2PO_4	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 ppm
CuSO_4	0.3
ZnSO_4	0.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.16
K_2MoO_4	0.02

(pH 6.0, 120°C 20分钟)

(14)

第6表 第7表

実験区	粒子表面濃度(1) (ケ/m ²)	生成ペレット濃度(2) (ケ/m ²)	C/P比 (1)/(2)	ベニシリング 単位/m ² *	生成ペレット濃度(2) (ケ/m ²)	生育乾燥 重量(g/ds)	C/P比 (1)/(2)	ミコフェノール酸 (mg/ds)
(15)								
A	9.6×10^3	1.1×10^2	8.727	1700	1×10^6	7×10^2	0.93	1.429
B	9.6×10^2	9.2×10^2	1.04	1800	1×10^3	1×10^0	0.01	1000

* 1 unit = 1/1677 mg ベニシリングナトリウム塩

(17)

成 分	濃度(g/ds)
ラクトース	3.0
グルコース	1.0
乳酸アンモニウム	0.55
酢酸アンモニウム	0.35
KH_2PO_4	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002
Na_2SO_4	0.05
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.002
CaCl_2	0.005

(pH 7.0, 120°C 20分殺菌)

(16)

実施例 5

セファロスボリン C 生産菌であるセファロスボリウム・ポリアレウラム AJ 6993 (ATCC 20359) を第9表に示す生育培地を使用する以外は実施例 3 と同一の方法で培養を行なった。

結果は第10表に示した。

成 分	濃度(g/ds)
シーチュース	3.6
グルコース	2.7
硫酸アンモニウム	0.75
DL-メチオニン	0.3
L-システィン塩酸塩	0.16
K_2HPO_4	2.10
KH_2PO_4	1.53
Na_2SO_4	0.075
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.018
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{6H}_2\text{O}$	0.015
CaCl_2	0.0053
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.003
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0003
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00035

(pH 7.4, 120°C 15分殺菌)

(18)

実施例 6

グルコアミラーゼ生産菌であるアスペルギルスニガ A J 7172 (ATCC 9642) を第 11 表の生産培地を使用する以外は実施例 3 と同一の方法で培養を行ない結果を第 12 表に示した。

第 11 表

成 分	濃度 (g/ds)
可溶性デンプン	5.0
味 液	3.0
硫酸アンモニウム	0.5
KH_2PO_4	0.3
CaCO_3 *	0.5

(pH 6.0, 120°C 15 分殺菌)

* 乾熱法で別殺菌した。

第 10 表

実験区	胞子表面濃度(1) (ケ/m ²)	生成ペレット濃度(1) (ケ/m ²)	C/P 比 (1)/(2)	グルコアミラーゼ (uunit/m ²)	生産ペレット濃度(2) (ケ/m ²)	C/P 比 (1)/(2)	セフアロスギリソ C (μg/m ²)
A	2.3×10^6	4.0×10^2	5.750	11.0	A	1.6×10^6	1.2×10^2
A	2.3×10^2	非生成(菌糸)	—	—	A	1.6×10^2	1.0×10^0
B	2.3×10^2	2.5×10^2	0.9	1.20	B	1.6×10^2	1.1
							1.92

(19)

(20)

第 12 表

実験区	胞子表面濃度(1) (ケ/m ²)	生成ペレット濃度(1) (ケ/m ²)	C/P 比 (1)/(2)	グルコアミラーゼ (uunit/m ²)
A	2.3×10^6	4.0×10^2	5.750	11.0
A	2.3×10^2	非生成(菌糸)	—	—
B	2.3×10^2	2.5×10^2	0.9	1.20

* 1 時間 = 30 分間にデルコース 1 mg相当量の生成物を与える活性

(21)

(22)

第 13 表

成 分	濃度 (g/dL)
グルコース	1.0
酵母エキス	0.3
麦芽エキス	0.3
ポリペプトン	0.5
寒天	1.5

(pH 7.0, 120°C 20分殺菌)

第 14 表

成 分	濃度 (g/dL)
可溶性アンプン	5.0
ポリペプトン	1.0
グルタミン酸	2.0
乾燥酵母	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
KH ₂ PO ₄	1.0
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.7
CaSO ₄ · 7H ₂ O	0.001

(pH 7.0, 120°C 20分殺菌)

(23)

第 15 表

実験区	脱水装置重量(1) (g/dL)	生成ペレット重量(2) (g/dL)	C/P比 (1)/(2)	ホスホマイシン (μg/dL)	
				(ケ/m ²)	(ケ/m ²)
A	2 × 10 ³	8 × 10 ⁰	250	—	—
B	2 × 10 ⁰	2 × 10 ⁰	1	25	—

(24)